

ANTI-C5A RECEPTOR ANTIBODY, ITS PRODUCTION AND USE

Patent Number: JP8109200

Publication date: 1996-04-30

Inventor(s): IIDA KYOKO; IWANE OSAMU; INUZUKA HIROYUKI

Applicant(s): TAKEDA CHEM IND LTD

Requested Patent: JP8109200

Application Number: JP19950166731 19950703

Priority Number(s):

IPC Classification: C07K16/28; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/577

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain the subject new antibody inhibiting the combination of a C5a receptor to a ligand, not neutralizing a biological activity produced by the combination of the ligand, useful for measuring the receptor of a complement ingredient having a biophylaxis function, etc., and used for researches, etc.

CONSTITUTION: The new anti-C5a receptor monoclonal antibody inhibiting the combination of the C5a receptor to the ligand but does not neutralizing a biological activity produced by the combination of the ligand. The anti-C5a receptor antibody is useful for the method for immunologically measuring the receptor of the complement ingredient C5a having a biophylaxis function, and extremely useful on the research of the action of the C5a on various diseases and on the research of the progress on the expression of the C5a receptor. The antibody is obtained by binding a polypeptide having the No. 1-20 amino acid sequence at the N-terminal of the C5a receptor to a carrier protein, administering the obtained hapten in a mouse, collecting the cells of the spleen after finally immunized, fusing the collected splenic cells to myeloma cells, selecting a specific antibody-producing strain, cloning the strain, and subsequently culturing the obtained hybridoma.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-109200

(43)公開日 平成8年(1996)4月30日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 16/28	Z NA	8318-4H		
C 12 N 5/10				
15/02				
	7729-4B	C 12 N 5/00	B	
	9281-4B	15/00	C	
		審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願平7-166731

(22)出願日 平成7年(1995)7月3日

(31)優先権主張番号 特願平6-195624

(32)優先日 平6(1994)8月19日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 飯田 恭子

大阪府大阪市都島区友淵町1丁目5番5-1610号

(72)発明者 岩根 理

兵庫県宝塚市口谷西3丁目58-3 ダイヤ
パレス宝塚701号

(72)発明者 犬塚 弘幸

大阪府池田市五月丘5丁目1番3号 武田
薬品五月丘寮内

(74)代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名)

(54)【発明の名称】 抗C 5 a レセプター抗体、その製造法および用途

(57)【要約】

【目的】ヒトC 5 a レセプターの免疫学的測定法において有用な抗C 5 a レセプターモノクローナル抗体を提供する。

【構成】C 5 a レセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C 5 a レセプターモノクローナル抗体、該抗体を產生するハイブリドーマ、該抗体を免疫学的に反応させることを特徴とするC 5 a レセプターの測定法。

【効果】本発明抗体は、C 5 a レセプターとリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しないことから、各種疾病におけるC 5 a の働き、あるいはC 5 a レセプターの発現の推移を探るうえで、極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】C 5 a レセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C 5 a レセプターモノクローナル抗体。

【請求項2】認識部位がC 5 a レセプターのN末端20アミノ酸残基からなる領域に存する請求項1記載の抗体。

【請求項3】モノクローナル抗体MH 1/20 である請求項1記載の抗体。

【請求項4】C 5 a レセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C 5 a レセプターモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。

【請求項5】C 5 a レセプターのN末端20アミノ酸残基からなるペプチド断片で免疫感作されたマウス脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞とを融合してなる請求項4記載のハイブリドーマ。

【請求項6】請求項4記載のハイブリドーマを液体培地または動物腹腔内で培養し、培養上清または腹水より抗体を採取することを特徴とする請求項1記載の抗体の製造法。

【請求項7】マウスハイブリドーマMH 1/20 である請求項4記載のハイブリドーマ。

【請求項8】C 5 a レセプターに請求項1記載の抗体を免疫学的に反応させることを特徴とするC 5 a レセプターの測定法。

【請求項9】フローサイトメトリー法である請求項8記載の測定法。

【請求項10】請求項1記載の抗体を含有するC 5 a レセプター測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞上に発現されているヒトC 5 a レセプターの免疫学的測定法およびその測定に用いるモノクローナル抗体、さらにはそのモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0002】

【従来の技術】生体には病原微生物その他の異物の侵入を阻止する防御機能として、抗体や感作リンパ球の関与する特異的防御機能と免疫の関与しない非特異的防御がある。非特異的防御機能として重要なものに補体がある。補体系は9つの蛋白質（詳しくは約20種）から成り、それぞれの成分は肝細胞やマクロファージによって作られ、正常な状態では体液中に不活性状態で個別に存在するが、抗原抗体複合体、細菌細胞壁その他により活性化され、生体防御因子として機能する。補体系の活性化が起こると、体液中の補体系タンパクが酵素分解され、種々の生物活性を有する断片が產生される。これらの補体タンパク断片のうち、C 3 a、C 4 a、C 5 a の3つは、アナフィラキシンと総称され、アナフィラキ

シーショックを含む色々な炎症反応を引き起こす化学媒体である。またこれらは、免疫調節物質としての作用も有していることが明らかにされている。これら3つのアナフィラキシンのうち最も強い炎症作用を引き起こす物質であるC 5 a は、補体第5成分C 5 が、C 5 転換酵素によって切断され產生される2断片のうち小さい方の断片すなわち、C 5 a鎖のN末端74個のアミノ酸残基から構成される分子量11,000の糖タンパク質である。C 5 a は、白血球遊走作用、血管透過性こう進作用、平滑筋収縮作用を持ち、単球に作用してサイトカインを產生させることにより免疫反応を調節する作用も有する。このため、敗血症、成人呼吸窮迫症候群、喘息、粥状動脈硬化症、心筋梗塞、脳梗塞等の虚血性疾患、乾せん、腎炎、さらには外傷や火傷など致死率の高い多くの疾患の原因物質となっている。

【0003】C 5 a がこれらの生物活性を現すには、その特異的レセプター、C 5 a レセプター（C 5 a R）に結合して細胞内に情報刺激が伝達される必要がある。ミエロイド細胞株HL 60 およびU 93 7 のc DNAから遺伝子クローニングがなされた結果、C 5 a R は350個のアミノ酸残基より構成される糖タンパク質で、7回膜貫通型の構造を有しており、細胞内のGタンパクと結合してその細胞内情報伝達を行うロドブシンレセプターの一員であることが明らかになっている（Gerard, N. P. および Gerard, C., ネイチャー（Nature）第349巻：614頁, (1991); Boulay, F. ら バイオケミストリー（Biochemistry）第30巻：2993頁, 1991）。C 5 a R を特異的に認識する抗体は、モノクローナル抗体（Oppermann, M. ら, ジャーナル オブ イムノロジー（The Journal of Immunology）第151巻：3794頁, 1993）およびポリクローナル抗体（Morgan, E. L. ら, 同誌 377頁）のいずれも1993年になって、はじめて作製された。Oppermann らによって作製されたモノクローナル抗体S 5/1 は、C 5 a R のN末端1番目から31番目までのアミノ酸配列を有するペプチドを牛アルブミンに結合させたタンパク質を免疫原として作製された。この抗体は、C 5 a R とリガンドC 5 a との結合を競合的に阻害しリガンド結合によっておこる好中球の生物活性を中和するもので、レセプターのN末端より数えて15番目から21番目のアミノ酸配列の部位を認識している。

【0004】これらの抗体は、リガンドの結合を阻害し、またレセプターの細胞表面での発現を蛍光抗体をもつてF A C S 解析をすることを可能にした。その結果、好中球、好酸球、単球上にC 5 a R が発現していることが明らかになった。しかしリガンドと競合阻害する故にいくつかの不利な点があった。すなわち血小板上にC 5 a R が存在するのかどうかは、モルモットの場合には、発現が証明されているもののヒトでは、議論の分かれるところである。中和抗体S 5/1 は、リガンドの結合部位と同じ部位に結合するため、少しの刺激で簡単に

活性化されてしまう血小板を扱う実験には、使用できない。そのためヒト血小板上のC5aR発現については、いまだに結論が得られていない。さらに、細胞上のC5aR発現量は、疾病などにより変化があるものと予想される。現存する中和抗体では、高感度なC5aRの定量化には、誰も成功していないのが現状である。さらにC5aRとリガンドとの結合には、1カ所だけではなくいくつかの部位の相互作用が関与しているといわれている。最近では、N末端以外にも細胞膜貫通部分によって取り囲まれた、芯(core)とよばれる部分も結合に関与しているという事実が示された(Siciliano, S.J.ら、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミーオブサイエンス(PNAS) 第91巻:1214頁, 1994年。N末端15から21番の配列をもつペプチドを認識するモノクローナル抗体が、C5aRとそのリガンドC5aとの結合を阻害し、リガンド結合によってもたらされる細胞の生物活性を阻止することが明らかにされているが、これと異なるペプチドを免疫原としてモノクローナル抗体を得、これがC5aとレセプターとの結合を阻害するかどうか、またC5a結合によって惹起される細胞の生物活性を阻止するかを調べることによって、リガンド結合部位の詳細な構造を解析し、レセプターによるシグナル伝達方法を明らかにしていく必要がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】炎症が起ったとき好中球などの多核白血球は細胞表面上のC5aRの発現を増やし、炎症部位への遊走を速め、また血管外への透過を亢進さらには、顆粒の放出等による生体防御をすると想像が出来る。これらの多核白血球に加え血小板は、刺激をうけて多くの生物活性を持つ分子を含む大量の顆粒を放出し、刺激からの生体反応としては、もっとも迅速な応答を行っている。そしてその結果血小板自身は、凝集をおこし死に至る。しかしC5aRの定量化が、可能にされていない現状では、C5aの刺激を受けた細胞がこのような現象をおこしているということは、想像の域を越えることは無い。C5aRが正確に定量出来るようになれば、疾患の経過を知り、病因および病態の解明のために非常に有用な情報を与えることはまちがいない。一方、リガンド結合部位を認識する抗体は、多くの場合レセプターに結合することによってリガンドと同じ効果、すなわちレセプターを介したシグナルを与えてしまう。この結果細胞が活性化され、細胞凝集、レセプターの内在化ひいては、細胞死に至ることになる。従って抗体の結合による細胞の活性化を引き起こさない抗体を用いての、レセプターの定量が望まれる。また上述したように、C5aR上のリガンド結合部位を特定し、複雑なりガンド結合に続くレセプター構造変化、さらにはシグナル伝達法を明らかにしていくためにも現存する中和抗体以外のモノクローナル抗体の使用が望まれる。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記事情を鑑み研究した結果、C5aRのN末端1番より20番のアミノ酸よりなるポリペプチドをキャリヤー蛋白キーホール リンペットヘモシアニン(KLH)とコンジュゲートしたKLH-C5aR₁₋₂₀を免疫原としてモノクローナル抗体を作成し、これを用いて細胞上に発現されているC5aRを安定に定量することを可能にした。この知見に基づき、さらに鋭意研究し、本発明を完成了した。即ち本発明は、(1) C5aレセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C5aレセプターモノクローナル抗体、(2) 認識部位がC5aレセプターのN末端20アミノ酸残基からなる領域に存する上記(1)記載の抗体、(3) モノクローナル抗体MH1/20である上記(1)記載の抗体、(4) C5aレセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C5aレセプターモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、(5) C5aレセプターのN末端20アミノ酸残基からなるペプチド断片で免疫感作されたマウス脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞とを融合してなる上記(4)記載のハイブリドーマ、(6) 上記(4)記載のハイブリドーマを液体培地または動物腹腔内で培養し、培養上清または腹水より抗体を採取することを特徴とする上記(1)記載の抗体の製造法、(7) マウスハイブリドーマMH1/20である上記(4)記載のハイブリドーマ、(8) C5aレセプターに上記(1)記載の抗体を免疫学的に反応させることを特徴とするC5aレセプターの測定法、(9) フローサイトメトリー法である上記(8)記載の測定法および(10)上記(1)記載の抗体を含有するC5aレセプター測定用試薬に関するものである。

【0007】本発明の抗C5aRモノクローナル抗体(mAb)は、公知の遺伝子工学的手法によっても作成できるが、通常、ハイブリドーマ法によって作成される。該抗体産生ハイブリドーマの作製は常法に従って実施される。すなわち、C5aRまたはその部分ポリペプチドキャリヤーコンジュゲートあるいは、C5aR発現細胞を動物に免疫し、抗体産生を確認する。ここで、免疫原としては、C5aR部分ポリペプチド、特にN末端20アミノ酸残基からなる部分ポリペプチドのキャリヤーとのコンジュゲートを用いることが好ましいが、目的の抗体が得られる限り、特にこれに限定されない。次に免疫動物より採取した抗体産生細胞、例えば脾臓細胞やリンパ節細胞などを骨髄種細胞(例、マウスの場合、N_{S-1}、P_{3U1}、S_{p2/0})と融合し、得られたハイブリドーマの中からC5aR部分配列ポリペプチドコンジュゲートに特異的に結合し、C5aR発現細胞に結合可能な抗体を産生する細胞をスクリーニングする。本発明において抗原として用いるC5aレセプターフラグメントペプチドキャリヤー蛋白結合体は、通常の方法に

よって作成される。すなわち(1)キャリヤー蛋白溶液(1mg/mlないし20mg/mlの濃度に調製し pH 7ないし8のもの)と(2)m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルキドエステル(3mg/mlの濃度ジメチルホルマミド中に調製したもの)(3)抗原ペプチド溶液(1mg/mlから10mg/mlの濃度に調製したもの)を用意し、蛋白溶液(1)に(2)をゆっくり加える。室温にて30分攪拌後、ゲルろ過カラムにて蛋白画分を集めこれを(3)のペプチド溶液に加え、室温でさらに3時間反応させる。この方法以外にたとえばグルタルアルデヒドによる重合法でもペプチド蛋白結合体を作ることが出来る。

【0008】免疫動物としては、例えばウサギ、ラット、マウス、ハムスター、モルモット等が用いられるが、マウスが特に好ましくもちいられる。接種方法としては、通常実施される方法に従えばよく、例えばC5aR部分配列ポリペプチドコンジュゲートの場合、マウスに1回0.05-30μg、好ましくは0.1-5μg、C5aR発現細胞の場合、マウスに1回10⁵-10⁷細胞数を、等容量の生理食塩水及びフロントの完全アジュvantで乳化して、背部、腹部の皮下あるいは腹腔内に2-3週毎に3-6回接種する方法が採られる。これらの免疫動物、例えばマウスから抗体価の高い個体を選択し、最終免疫3-5日後に脾臓及び/あるいは、リンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させる。融合操作は既知の方法に従って実施できるが、融合促進剤としては、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられ、好ましくはPEGが繊用される。骨髄腫細胞としては、NS-1、P3U1、Sp2/0などが挙げられ、特にP3U1が好ましく用いられる。脾臓細胞と骨髄腫細胞との好ましい比率は1:1-10:1で、これに平均分子量約1000-8000のPEGが、10-80%の濃度で添加され、20-37°Cで3-10分間反応するのがよい。

【0009】抗C5aRmAb産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できる。例えば、マイクロプレート上にC5aRまたは免疫を用いたC5aR部分ポリペプチドとBSA(牛血清アルブミン)のコンジュゲート(例えば、BSA-C5aR₁₋₂₀)を常法に従って固定化し、抗原感作プレートを作成する。次いでハイブリドーマ培養上清をこの抗原感作プレートに添加し、プレート上に結合した抗C5aR抗体を検出する。酵素免疫測定法(ELISA)により培養上清中の抗体価を測定する。HAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン)添加培地で選別、育種された抗体活性陽性のハイブリドーマは直ちにクローニングに供されるが、通常このクローニング操作は限界希釈法などで容易に実施される。クローニングされたハイブリドーマの培養上清を上記のELISAに供し、抗体活性陽性示すも

のうち、C5aR発現細胞(例えば好中球など)に結合し蛍光標識二次抗体を用いて検出される抗体産生ハイブリドーマを選別し、目的とする抗C5aモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する事が出来る。以上のような製造法に従って作成した抗C5aRmAb産生ハイブリドーマの例として、後述の実施例1-(3)に示すハイブリドーマMH1/20が挙げられる。上記した本発明のハイブリドーマの培養は通常、液体培地中または動物腹腔内(例えば、マウスなど哺乳類を使用)で公知の方法により実施出来る。培養液および腹水液中の抗体の精製についても公知の生化学的手法を組み合わせて実施出来る。例えば、細胞培養液あるいは腹水液を遠心分離後、塩析(通常硫酸アンモニウムもしくは硫酸ナトリウムを使用)し、得られた蛋白沈澱物を適當な溶液に溶解し透析する。次いでカラムクロマトグラフィー(イオン交換カラム、ゲルろ過カラム、プロテインAカラム、プロテインGカラム、ヒドロキシアバタイトカラムなど)に供し、目的とする抗体を分離精製出来る。以上のような分離精製操作により、例えば蛋白質として90%以上の純度のmAbを、1Lの細胞培養上清から約5-20mg、20mlの腹水液からは約20-100mg得られる。

【0010】以上のようにして得られたmAbはタンパク質として均一であり、蛋白分解酵素処理などにより、C5aRに対する結合能を保持したままF(ab')₂やF(ab)断片などを調製でき、これらは本発明のmAb全IgG分子と同様の目的に用いられるものであり、本発明でいう「抗ヒトC5aRモノクローナル抗体」に含まれる。またこれらのハイブリドーマがマウスIgGmAbを産生する場合には、該抗C5aRmAbの抗原認識部位をふくむ可変領域あるいは超可変領域をコードするDNAを取得し、これに遺伝子操作技術(Z. Steplewskiら、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 第85巻:4852頁、1988; L. Reichmannら、ネイチャー(Nature), 第332巻:323頁、1988)を用いてヒトIgGの定常領域あるいは/および可変領域フレームワークをコードする遺伝子を結合させ、マウスヒト・キメラ抗体あるいはヒト型化抗体を作成する事もできる。

【0011】上記により得られた本発明精製抗体は、放射性同位元素、酵素、発光物質、蛍光色素等で常法に従って標識化されて各種の免疫測定法に試薬として用いられる。放射性同位元素としては、たとえば¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどが、酵素としては、安定で比活性が大きなものが好ましく、例えば、(1)カルボヒドラーーゼ(例、グリコシダーゼ(例、β-ガラクトシダーゼ、β-グリコシダーゼ、β-グルクロシダーゼ、β-フルクトシダーゼ、α-ガラクトシダーゼ、α-グルコシダーゼ、α-マンノシダーゼ、アミラーゼ(例、α-アミ

ラーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルコアミラーゼ、タカアミラーゼA)、セルラーゼ、リゾチム)】、(2)アミラーゼ(例、ウレーゼ、アスパラギナーゼ)、(3)エステラーゼ(例、コリンエステラーゼ(例、アセチルコリンエステラーゼ)、ホスファターゼ(例、アルカリホスファターゼ)、スルファターゼ、リバーゼ)、(4)ヌクレアーゼ(例、デオキシリボヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ)、(5)鉄・ポルフィリン酵素(例、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、チトクロームオキシターゼ)、(6)銅酵素(例、チロシナーゼ、アスコルビン酸オキシターゼ)、(7)脱水素酵素(例、アルコール脱水素酵素、リング酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素)などが、発光物質としてはルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリン、フルオレスカミン、フルオレッセンスイソチオシアネットなどが挙げられる。上記の標識試薬のなかでも、蛍光試薬がより好ましく用いられる。以下に細胞上に発現されているヒトC5aRの本発明抗体を用いた免疫学的測定法の操作について具体的に説明するが、これに限定されるものでないことは言うまでもない。

【0012】(1)間接染色法

10⁵~10⁶個の細胞を遠心分離によって細胞ペレットとし、これに0.01%アジ化ナトリウムと1%BSAあるいは、1%FCSを含む適当な緩衝液で希釈したmAbを20 μ l添加する。該抗体の濃度は1~100 μ g/ml、好ましくは、5~50 μ g/mlである。緩衝液はハンクスバランスドソルトソルーション(HBSS)あるいは、RPMI 1640などの培地等が用いられる。細胞のかわりに血小板を用いるときは、これらの緩衝液に10%の容量の日局クエン酸ナトリウムの3.8%水溶液を加える。細胞と抗体との反応は、約0℃~30℃にて20分~1時間行う。反応終了後、反応液に抗体希釈に用いた緩衝液を1ml加え遠心分離する。遠心上清を取り除き、細胞ペレットに標識したF(ab')₂抗マウスIgG抗体を適当に希釈して20 μ l加える。該標識抗体の濃度は、標識の強さあるいは、抗体価によってことなるが、通常0.1~50 μ g/mlで用いられる。同様の反応条件で20分から1時間反応させた後緩衝液を加えて洗浄する。標識抗体により標識された細胞などは適当な解析装置を用いて測定すればよい。例えば、蛍光染色された細胞あるいは、血小板などはFACStarなどの解析装置にて解析する。

2)直接染色法

1)の方法の第1段階に反応させる抗C5aR抗体を蛍光色素などの標識剤で標識しておく方法であり、反応は1段階のみである。希釈液、反応時間、などの条件は、1)の方法と同じである。

【0013】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体

的に説明するが、これらが本発明の範囲を制限するものでないことは言うまでもない。なお、実施例で得られたハイブリドーマMH1/20は、平成6年8月5日より財団法人発酵生物研究所(IFO)に受託番号IFO 50443として、また、平成6年8月23日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に、受託番号FERM BP-4784として寄託されている。

実施例1 マウス抗C5aRmAb産生ハイブリドーマの作製

(1)免疫

C5aRN末端1~20番目の配列(NH₂-MNSF NYTTPDYGHYDDKDTL-COOH)【配列番号1】をもつポリペプチドをキャリヤー蛋白KLHにコンジュゲートしたKLH-C5aR_{1~20}をフロイント完全アジュバントと等量混ぜ合わせて乳化しBALB/cマウスの腹腔内に1回5 μ g、3週間の間隔をおいて5回免疫した。なお初回以外は、フロイントの不完全アジュバントを用いた。各免疫後2週間目に採血し血中の抗体価を、BSA-C5aR_{1~20}(C5aRN末端1~20番目のポリペプチドをキャリヤー蛋白BSAにコンジュゲートしたもの)を抗原としたELISAで測定した。

すなわちBSA-C5aR_{1~20}を20 μ g/ml、各ウエル50 μ lずつコートし、1%BSAを含むPBSでブロックした。そこへ、希釈した免疫マウス血清を50 μ lずつ加え、37℃で1時間反応させた。ウエルを0.01%Tween 20を含むPBSでよく洗った後、西洋ワスピバーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を添加し1時間反応させた。洗浄後、酵素基質としてO-フェニレンジアミンおよびH₂O₂を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.5)を加えて室温で酵素反応を実施した。1N硫酸で反応を停止後、490nmの吸光度を測定した。5回目の免疫で抗体価が最高値を示した個体について、さらにKLH-C5aR_{1~20}溶液を静脈内投与した。

【0014】(2)細胞融合

最終免疫後3日で脾臓を摘出し、脾臓細胞懸濁液を常法により調製した(約10⁸個)。次いでマウス骨髄腫細胞P3U1(2×10⁷個)を添加し、ポリエチレンリコールPEG6000をもちいて融合した(ケーラーとミルスタインネイチヤー(Nature)第256巻:495頁,1975年)。融合終了後、細胞混液をヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含む、いわゆるHAT培地中に懸濁し10日間培養した。以後は親細胞株の選択除去が終了次第HAT培地からアミノブテリンを除いたHT培地に変え培養を続けた。

(3)ハイブリドーマの選択およびクローニング

融合10~20日後にハイブリドーマの出現を認めたので、(1)で記述したBSA-C5aR_{1~20}を抗原とするELISAにより、ハイブリドーマ培養上清中の抗体

価を測定した。強い抗体活性を示したハイブリドーマについては、限界希釈法によるクローニングを行った。これらのハイブリドーマにつき末梢血から分離した好中球への抗体結合をフローサイトメトリー解析で検定を行った。すなわち好中球にハイブリドーマ培養上清を加え、0℃ 30分間反応させた。次いで、1回洗浄後、2次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体と反応させた。30分反応後 FACSstar (ベクトンディキンソン社) に供した。MH1/20 抗体のみが好中球に結合した。MH1/20 抗体は、IgG1, κサブクラスであることをサブクラス確認キットで決定した。

(4) MH1/20 抗体の精製

予め 0.5ml 鉱油を腹腔内投与した BALB/c マウスに、ハイブリドーマ細胞 MH1/20 2×10^6 個を腹腔内投与した。約 10-15 日後に腹水を採取しプロテイン G を用いるアフィニティクロマトグラフィーにより常法通り MH1/20 抗体を精製した。

【0015】実施例 2 C5a 惹起好中球活性化阻止試験

(1) P39 (+) 細胞の分化

P39 (+) 細胞は、骨髄腫患者の細胞より樹立されたミエロイド細胞株 P39 細胞から補体第3成分 (C3) を結合し凝集能をもつサブラインとして樹立された細胞株である (Matsumoto, M. ら, ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー (Eur. J. Immunol.) 第21巻: 1787頁, 1991年)。この細胞は、ジブチリル cAMP を添加して培養すると細胞質内に顆粒をもち多型核化して好中球様の細胞に分化する。分化の指標の1つとして C5aR の発現があり、分化した細胞に C5a を添加すると反応液中に顆粒を放出する。従って顆粒中の酵素の1つ N-アセチル-D-グルコサミニダーゼを定量する事によって分化の度合いを調べることができる。この原理を用い P39 (+) 細胞の分化を観察した。その方法は次のとおりである。分化した細胞を2回洗浄した後 10⁷ /ml HBS S に調製し終濃度 5 μg/ml の Cytochalasin B で 15 分間反応させた。この細胞懸濁液 100 μl に希釈した C5a 100 μl を加え 37℃ で 1 時間反応させた。反応混液を 1500 回転にて 10 分間遠心し上清 100 μl を 96 穴プレートに移し、これに基質 p-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミドを 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.5) 中で 1 時間反応し 0.4 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) を添加して反応を停止、405 nm で吸光度を測定した。この結果は (図 1) に示すとおり P39 (+) 細胞 (●) は、2 日間で分化しその後は、急速に細胞死に到った。なお、対照としてジブチリル cAMP 非測定 (□) および C5a 非添加 (○) P39 (+) 細胞の酵素活性を同様の方法で測定した。

(2) 抗体による C5aR の機能阻害試験

上記実施例 1-(1) で示した P39 (+) 細胞分化の

10

条件すなわち 0.5 mM ジブチリル cAMP 中で 2 日間分化させた細胞をもちいて 0.1, 0.3, 1 および 3 nM の C5a 刺激による酵素の放出を同様の方法で測定した。このとき MH1/20 抗体 (20 μg/ml) が存在しても放出される酵素の量には殆ど差は見られなかつた (図 2)。なお、図中、□は抗体共存下の酵素量を○は抗体非存在下 (対照) の酵素量を示す。

【0016】実施例 3 C5a 結合阻害活性試験

C5a の C5aR への結合は、¹²⁵I-C5a を用い、好中球、単球、あるいは、株化した細胞などへの結合を 30 分から 1 時間反応させ、未結合分を遠心分離で除いた後、放射活性を測定することによって定量できる。この結合を阻害する物質を探索する場合などは、多くのサンプルを同時に定量する必要があるが、こういう場合には、細胞膜を調製し、¹²⁵I-C5a の膜への結合を調べる方法を用いることができる。

(1) 膜画分の調製

分化 P39 (+) 細胞を HBS S で洗浄し、0.25 M ショ糖、0.04 M NaCl, 0.1 M KCl, 0.00

20 5 M MgCl₂, 0.02 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) にインヒビターカクテル {10 μM ロイベブチン, 10 μM ベプスタチン, 50 μM 0-フェナントロリン, 100 KIU アプロチニン, 100 μM p-アミジノフェニルメタンスルホニル フルオリド 塩酸 (p-APMSF) } を加えたものに懸濁した。テフロンホモゲナイザーに細胞懸濁液をいれて、氷上 10-40 ストローク破碎を行う。顕微鏡で細胞膜が破碎され、核膜は保持されているのを確認した。3000 回転 10 分間遠心し、核及び破碎されなかつた細胞を除き、上清に 5 mM EDTA を加えて、100,000 回転 20 分間遠心して得られた沈殿を PBS に上記のインヒビターカクテルと 5 mM EDTA を加えた溶液に懸濁し、これを膜画分として用いた。

(2) C5a 結合試験

上記 (1) で調製した膜画分 10⁶ 個細胞相当に ¹²⁵I-C5a (10,000 cpm) を加え、氷上 60 分間反応後、グラスフィルター (Whatmann GF/B) 上で吸引濾過し 3 回洗浄した。フィルターにトラップされた放射活性を測定した。この結合反応の特異性を示すため、放

40 射ラベルしていないコールド C5a を量を変化させて反応系に加えたところコールド C5a の濃度依存性の結合阻害がみられ、結合がレセプター/リガンド特異的に起こっていることが示された (図 3)。この反応系にモノクローナル抗体 MH1/20 を加えた時、抗体濃度依存的に ¹²⁵I-C5a 結合阻害がみられた (図 4)。上記実施例 (2) において、MH1/20 が C5a 惹起 P39 (+) 細胞の機能阻害はしないことと合わせ、C5aR と C5a の結合様式が 2 箇所以上であることを示している。

【0017】実施例 4 フローサイトメトリー

(1) 多核白血球細胞

末梢血から分離した好中球、および分化P 3 9 (+) 細胞についてMH 1 / 2 0 抗体の結合をフローサイトメトリー解析によって定量した。1 0⁶ 個の細胞をF I T C 標識したMH 1 / 2 0 抗体 (2 0 μ g / ml) と0. 0 1 % アジ化ナトリウム、1 % F C S の存在下氷上で3 0 分間反応させた。同緩衝液で1回洗浄しF A C S t a r に供した。結果は、〔図5〕～〔図7〕に示すとおり、好中球〔図5〕P 3 9 (+) 〔図6〕ともにほとんどすべての細胞が強く染色されておりC 5 a R を大量に発現していることが分かる。一方、未分化のP 3 9 (+) は、全くMH 1 / 2 0 抗体を結合していなかった〔図7〕。なお、図中点線は、MH 1 / 2 0 抗体、直線は対照であるO K T 3 抗体との反応を示す。

(2) 血小板および巨核芽球細胞M E G 0 1

1. 血小板の分離

血小板は、わずかな刺激で簡単に活性化され凝集してしまって、次のような方法で分離ができるだけ活性化を抑えた。すなわち1 0 % 容量のチトラール（日本薬局方クエンサンナトリウムの3. 8 % 水溶液）中で静かに採血し、ただちに3 0 0 0 回転で遠心した。3 0 0 0 回転到達後5 秒間で遠心を止め、上清を血小板濃縮血漿（P R P）として用いた。ここで血小板を洗浄する必要のあるときは、5 mM E D T A を含むTyrode 緩衝液を用い、9 0 0 0 回転2 秒間の遠心を行った。

2. 血小板へのMH 1 / 2 0 抗体の結合

血小板上には、C 5 a R が発現していても少數であると予想できるので、(1) でもちいた直接染色法ではなく間接染色法を用いて、コントロール抗体によるバックグラウンドをより正確に比較した。すなわちP R P 1 0 0 μ l にMH 1 / 2 0 抗体あるいはコントロール抗体としてT細胞とのみ反応するO K T 3 抗体 (A T C C C R L 8 0 0 1 細胞培養上清より取得) を1 0 μ l 加え、氷上3 0 分間反応させた。5 mM E D T A を含むT y r o d e 緩衝液1 mlを加えて、9 0 0 0 回転到達後2 秒間遠心した。上清を除きペレットに2次抗体F I T C 標識*

配列:

Met Asn Ser Phe Asn Tyr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp

1

5

10

15

Lys Asp Tyr Leu

20

【図面の簡単な説明】

【図1】は、ミエロイド細胞P 3 9 (+) の分化を示す。

【図2】は、抗体共存時の分化P 3 9 (+) 細胞のC 5 a 刺激によるN-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ放出反応を示す。

【図3】コールドC 5 a 添加による分化P 3 9 (+) 細胞膜画分に対する標識C 5 a の結合阻害を示す。

【図4】MH 1 / 2 0 抗体添加による分化P 3 9 (+) 50

*ヤギ抗マウスI g G を加えて、氷上3 0 分間反応させた。この反応混液に1 % B S A と5 mM E D T A を含むP B S を1 ml 加えてF A C S t a r に供した。正常人6 名の血小板について調べた結果いずれも有意な抗体結合は見られなかった。コントロールとして、血小板の表面抗原マーカーであるG I I b / I I I a に対する抗体(ニチレイ)を用いると強い結合がみられた〔図8〕。なお、図中、破線は、G P I I b / I I I a 、直線はC 5 のレセプターラインはO K T 3 抗原の発現を示す。

3. 巨核芽球細胞M E G 0 1 の分化とMH 1 / 2 0 抗体の結合性

血小板の前駆細胞とされている巨核芽球細胞株M E G 0 1 (I F O 5 0 1 5 1) は、適当な刺激を与えると分化して血小板様の粒子を放出するようになる。そこで、M E G 0 1 に0. 5 mM ジブチリル c A M P を添加して、経時的にMH 1 / 2 0 抗体の結合性を実施例4-(1) と同じ方法で調べたところ、5 日目をピークに抗体結合が見られた。未分化のM E G 0 1 にも抗体が結合している細胞が見られた〔図9〕～〔図15〕。図中、直線はMH 1 / 2 0 抗体、点線は対照であるO K T 3 抗体による染色を示す。

【0 0 1 8】

【発明の効果】本発明抗体は、C 5 a レセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しないことから、各種疾患における、C 5 a の働き、あるいはC 5 a レセプターの発現の推移を探るうえで、極めて有用であり、このことは現存の抗C 5 a 抗体を用いた系では結論が得られていなかった血小板上のC 5 a の存在の有無を本実施例において明瞭に確認していることからも明らかである。

【0 0 1 9】

【配列】配列番号(SEQ ID NO): 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 2 0

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸

配列の種類(MOLECULE TYPE): ベプチド

細胞膜画分に対するC 5 a の結合阻害を示す。

【図5】末梢血中より分離した多核白血球表面でのC 5 a R の発現の解析。

【図6】分化P 3 9 (+) D細胞でのC 5 a R の発現の解析。

【図7】未分化P 3 9 (+) 細胞でのC 5 a R の発現の解析。

【図8】ヒト正常血小板上でのC 5 a R の発現の解析。

【図9】巨核芽球細胞の分化に伴うC 5 a R の発現の推

13

移。ジブチルcAMP添加後（0日）

【図10】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後（2日）

【図11】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後（3日）

【図12】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後（4日）

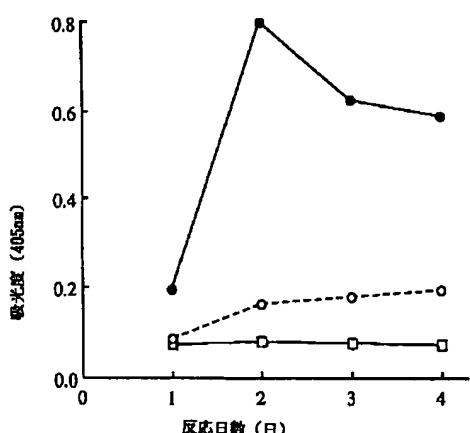
14

【図13】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後（5日）

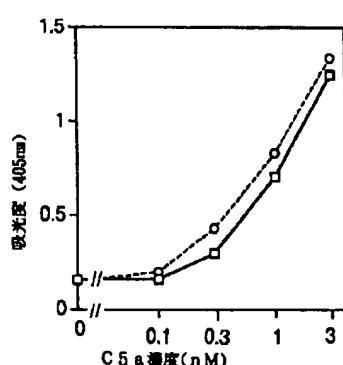
【図14】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後（7日）

【図15】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後（9日）

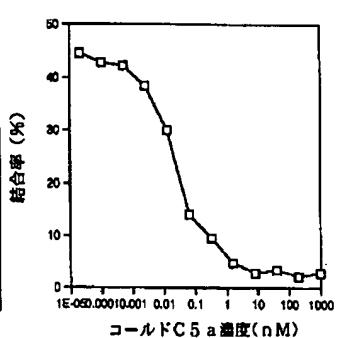
【図1】



【図2】

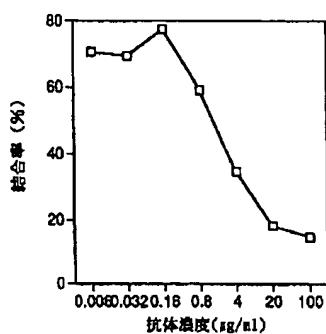


【図3】

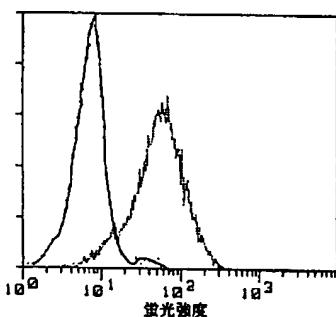
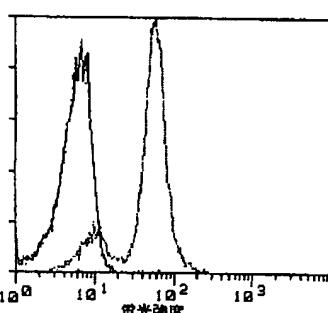


【図6】

【図4】

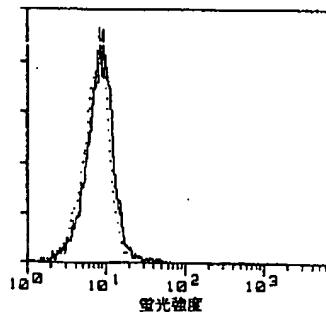


【図5】

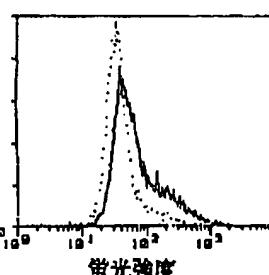
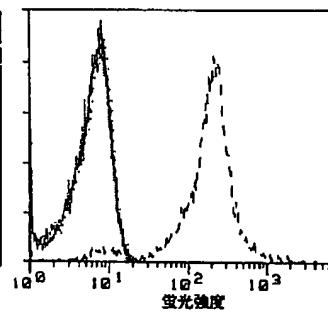


【図9】

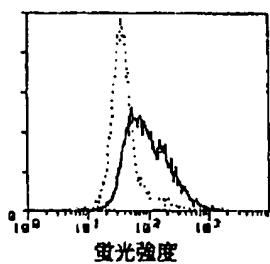
【図7】



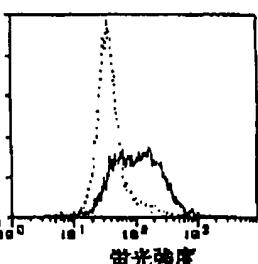
【図8】



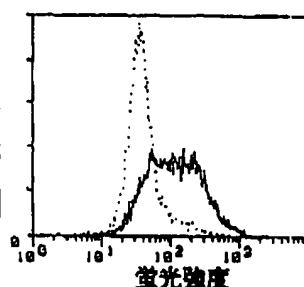
【図10】



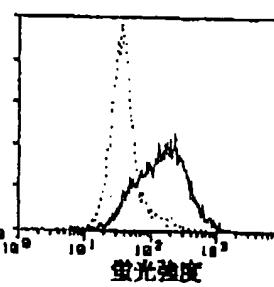
【図11】



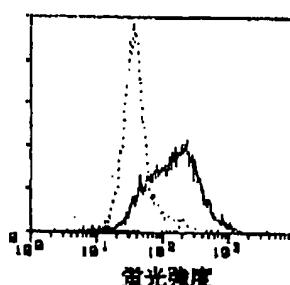
【図12】



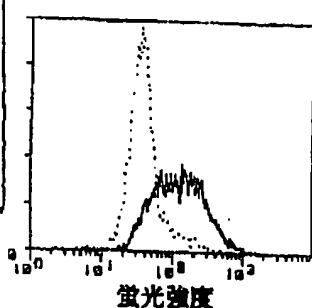
【図13】



【図14】



【図15】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 21/08

9358-4B

G 0 1 N 33/577

// A 6 1 K 39/395

N

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)